

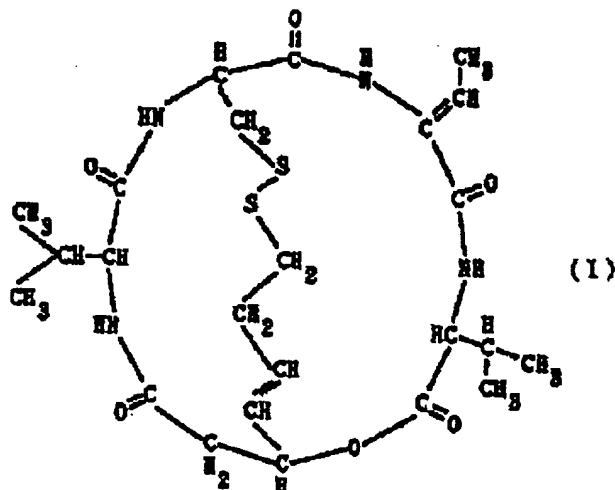
**GENE EXPRESSION PROMOTING AGENT**

**Patent number:** JP2001316283  
**Publication date:** 2001-11-13  
**Inventor:** KANEDA YASUSHI; YAMANO TOMOMOTO;  
NAKAJIMA SHUSUKE  
**Applicant:** KANEDA YASUSHI;; FUJISAWA PHARMACEUTICAL  
CO  
**Classification:**  
**- international:** A61K38/00; A61K48/00; A61P43/00; C07K5/12;  
C12N9/99; C12N15/09  
**- european:**  
**Application number:** JP20000256141 20000825  
**Priority number(s):** JP20000052582 20000228; JP20000256141 20000825

Report a data error here

**Abstract of JP2001316283**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide FR901228 or its salt used as an active component habing an expression promoting activity and a reactivation promoting activity on a transduced gene in vivo as well as in vitro and suitable for clinical use, especially for gene therapy. **SOLUTION:** The expression promoting agent and reactivation promoting agent for a transduced gene is composed of FR901228 expressed by formula 1 or its salt.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

esp@cenet document view

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-316283

(P2001-316283A)

(43) 公開日 平成13年11月13日 (2001. 11. 13)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 48/00	4 B 0 2 4
48/00		A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00			1 1 1 4 H 0 4 5
	1 1 1	C 0 7 K 5/12	
C 0 7 K 5/12		C 1 2 N 9/99	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-256141 (P2000-256141)

(22) 出願日 平成12年 8 月25日 (2000. 8. 25)

(31) 優先権主張番号 特願2000-52582 (P2000-52582)

(32) 優先日 平成12年 2 月28日 (2000. 2. 28)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成11年 8 月30日  
日本癌学会発行の「第58回日本癌学会総会記事」に発表

(71) 出願人 596017923

金田 安史

大阪府箕面市小野原東 6-12-8

(71) 出願人 000005245

藤沢薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 4 番 7 号

(72) 発明者 金田 安史

大阪府箕面市小野原東 6-12-8

(72) 発明者 山野 智基

愛媛県南宇和郡御荘町平城53

(74) 代理人 100080791

弁理士 高島 一

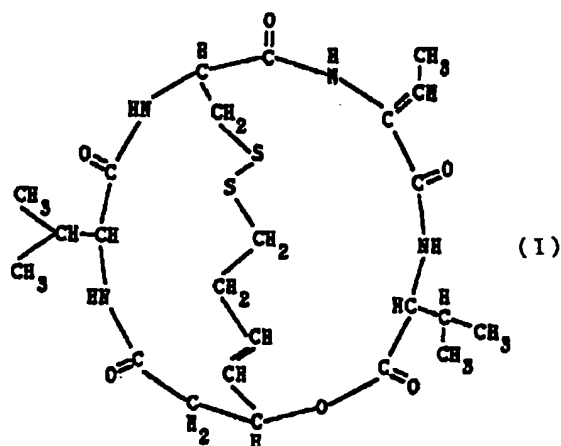
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子発現増強剤

(57) 【要約】

【解決手段】 式 (I)

【化 1】



で表される F R 9 0 1 2 2 8 またはその塩からなる導入  
遺伝子の発現増強剤および再活性化促進剤。

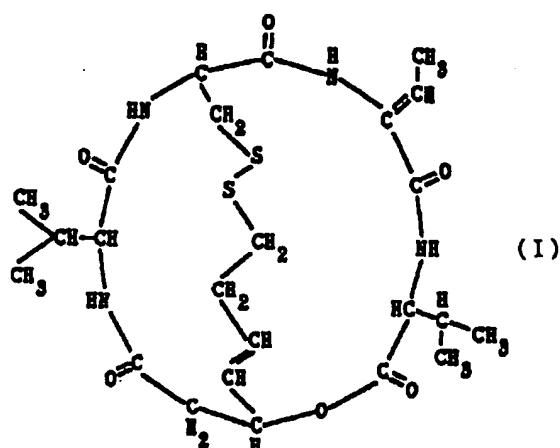
【効果】 本発明に活性成分として含まれる F R 9 0  
1 2 2 8 またはその塩は、インビトロのみならずインビ

ボでも優れた導入遺伝子の発現増強作用ならびに再活性  
化促進作用を示す。従って、臨床での使用に適し、特に  
遺伝子治療に好適に使用し得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式(1)

【化1】



で表される化合物またはその塩を有効成分として含有する導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

【請求項2】 インビボにおける導入遺伝子の発現増強または再活性化促進を特徴とする請求項1記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

【請求項3】 医薬である請求項1または請求項2記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

【請求項4】 医薬が遺伝子治療用である請求項3記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、導入遺伝子の発現増強剤および再活性化促進剤に関する。より詳しくはヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する化合物を含有する導入遺伝子の発現増強剤および再活性化促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子治療は、難病治療に有効な手段であると考えられ、米国では300を超える遺伝子治療のプロトコールが提出されている(1999年6月現在)。しかしながら、少数の症例に成功を見たに過ぎず、これらの結果は遺伝子治療が克服しなければならない以下のような本質的課題を明らかにしている。

- (1)より遺伝子導入効率に優れたベクターの開発
- (2)非増殖細胞への遺伝子導入効率の増大
- (3)導入遺伝子の持続的高発現の実現

【0003】リボソームベクターの開発やアデノウイルスベクター等の開発により、第一および第二の課題に関しては対処されつつある。しかしながら、第三の課題に関しては、治療法として極めて本質的な問題でありながら開発が遅れている。この課題の根本は、臨床における導入遺伝子の低発現あるいは発現抑制にある。導入された遺伝子が、ヒトの細胞で持続的に発現するためには、寄主細胞のゲノムに導入遺伝子が安定的に組み込まれる

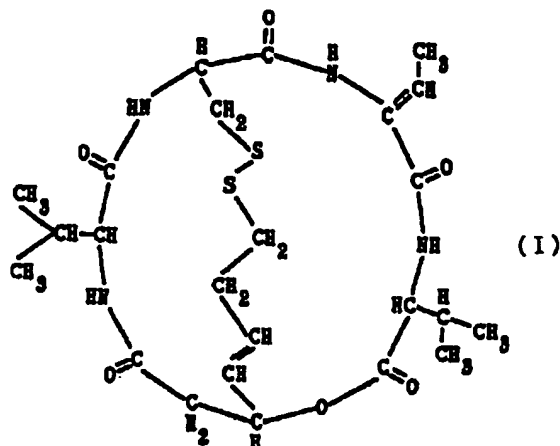
ことが必要である。しかしながら、外来遺伝子は、ゲノムに組み込まれた後、発現抑制(サイレンシング)を受けることが多いことが報告されている。ゲノムに組み込まれた遺伝子のサイレンシングは、組み込まれた部位のゲノム構造の変化(クロマチンの構造変化)に起因すると推定されて、ヒストンのアセチル化と脱アセチル化の関与が考えられてきた。このようなサイレンシングはゲノムに組み込まれず核内に存在するプラスミドDNAにおいても見られることが明らかとなってきた。近年、ヒストン脱アセチル化酵素(ヒストンデアセチラーゼ)の特異的阻害剤の利用が可能となった。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤は、ヒストンの脱アセチル化を抑制することにより、クロマチンの状態を高アセチル化状態へと誘導する。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を用いて、ヒストンの低アセチル化状態と転写抑制状態、高アセチル化と転写活性化状態の関連が明らかにされ、ヒストンのアセチル化と脱アセチル化の転写調節における重要性が実験的に実証されつつある。

【0004】最近、インビトロで、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を用いた導入遺伝子の転写再活性化(サイレンシングの解除)が報告された(Dion, L. D.ら; Virology 231, 201-209 (1997)、Chen, W. Y.ら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5798-5803 (1997))。これは、薬剤による第三の課題解決を示唆するものである。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤としては、トリコスタチンAや、sodium butyrate等が報告されているが、吸収・血中動態が悪く、あるいはその作用が不十分な為、インビボでの効果は報告されておらず、また臨床上的利用、特に遺伝子治療への適用は困難なものと考えられている。加えて、臨床上的有用性を示唆する、個体レベルでのヒストンデアセチラーゼ阻害剤の転写活性化の報告はまだない。

【0005】一方、下記式(1)で表される化合物

【0006】

【化2】



【0007】は、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有することが報告されており (Nakajima, H.; Experimental Cell Research 241, 126-133 (1998))、また、臨床上有用な抗癌剤としての用途が報告されている (特公平7-64872号公報)。しかしながら、当該化合物の導入遺伝子の発現や再活性化に及ぼす影響については記載されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、導入遺伝子の持続的発現が可能となる、導入遺伝子の発現増

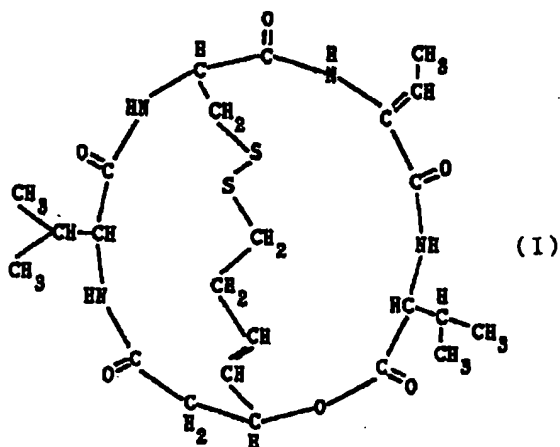
強剤および再活性化促進剤を提供することにある。さらに本発明の別の目的は、医薬として使用できる、特に遺伝子治療に好適に使用できる導入遺伝子の発現増強剤あるいは再活性化促進剤を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するため鋭意検討した結果、下記式 (I)

【0010】

【化3】



【0011】で表される化合物またはその塩がインビトロのみならずインビボでも優れた導入遺伝子の発現増強ならびに再活性化促進作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 式 (I) で表される化合物またはその塩を有効成分として含有する導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

(2) インビボにおける導入遺伝子の発現増強または再活性化促進を特徴とする上記 (1) 記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

(3) 医薬である上記 (1) または (2) 記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

(4) 医薬が遺伝子治療用である上記 (3) 記載の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤。

【0012】本発明の導入遺伝子の発現増強剤および再活性化促進剤は、活性成分として式 (I) で表される化合物またはその塩を有する。当該化合物は強力なヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有する (Nakajima, H. ら; 上述 (1998))。

【0013】式 (I) 化合物は、クロモバクテリウム・ビオラセウム (Chromobacterium violaceum) WB968株 (F

ERM BP-1968) 等のクロモバクテリウム属に属する式 (I) 化合物 (以下、単にFR901228ともいう) 生産菌を栄養培地中で培養することにより製造することができる。より具体的には特公平7-64872号公報に記載のとおりにして当該生産菌から得ることができる。また、FR901228は、上記クロモバクテリウム属菌の培養による採取という発酵法による製造の他に、従来公知の方法により半合成、全合成することができる。より具体的にはKhan W. Li, らによって報告されている方法 (J. Am. Chem. Soc., vol. 118, 7237-7238 (1996)) に準じて製造することができる。

【0014】FR901228の塩は生物学的に許容される通常無毒の塩であり、無機塩基との塩 (例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩)、有機塩基との塩 (例えばトリエチルアミン塩、ジイソプロピルエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン塩等の有機アミン塩)、無機酸付加塩 (例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等)、有機カルボン酸・スルホン酸付加塩 (例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等)、塩基性あるいは酸性アミノ酸 (例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等) との塩等の、塩基との塩または酸付加塩が挙げられる。

【0015】FR901228は、不斉炭素原子および二重結合に基づく光学異性体または幾何異性体等の立体異性体を有することがあるが、これらすべての異性体及びそれらの混合物もこの発明の範囲に含まれる。さらに、FR901228またはその塩の溶媒和化合物 (例えば包接化合物 (例えば水和物等)) もこの発明の範囲に含まれる。

【0016】本発明において、インビボ、インビトロとは通常、当分野で用いられている用語どおりであり、すなわち、「インビボ」とは、対象とする生体の機能や反応が生体組織内で発現される状態を意味し、「インビトロ」とは当該機能や反応が組織培養系、細胞培養系、無細胞系等で発現されることを意味する。

【0017】本発明において、導入遺伝子の発現増強とは、ヒトをはじめ、マウス、ラット、ブタ、イヌ、ウマ、ウシ等各種の動物細胞に、遺伝子工学的手法により導入される外来遺伝子の寄主細胞中での発現を増強することを意味する。当該導入遺伝子の発現増強は、細胞レベル (すなわちインビトロ) で行われるものであっても、動物レベル (すなわちインビボ) で行われるものであってもよい。好ましくはインビボで行われる。

【0018】本発明において、導入遺伝子の再活性化と

は、ヒトをはじめ、マウス、ラット、ブタ、イヌ、ウマ、ウシ等各種の動物細胞に遺伝子工学的手法により導入された外来遺伝子の発現抑制 (サイレンシング) の解除を意味し、本発明は当該再活性化を促進することができる。さらに本発明はサイレンシングの解除以外に一定レベルで安定的に発現している導入遺伝子に対しても転写活性を促し、その発現を増強させることができる。このような効果も本発明の「導入遺伝子の再活性化」に含まれる。当該導入遺伝子の再活性化促進は、細胞レベル (すなわちインビトロ) で行われるものであっても、動物レベル (すなわちインビボ) で行われるものであってもよい。好ましくはインビボで行われる。

【0019】当該外来遺伝子の導入は、当分野で公知の手法を用いて行うことができる。例えば、物理的な方法によるDNAの導入 (マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等)、化学的な方法によるDNAの導入 (リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リボソーム法等)、生物学的な方法 (レトロウイルスやアデノウイルスといったウイルスベクター等) の他、HVJ-リボソーム法等の新しい手法も好適に利用することができる。

【0020】本発明の導入遺伝子の発現増強剤および再活性化促進剤は、活性成分としてのFR901228またはその塩を、経口または非経口適用に適した有機または無機の担体または賦形剤との混合物として含有する固体、半固体または液体形態の医薬製剤の形で使用できる。該活性成分は、例えば、散剤、錠剤、ペレット剤、カプセル剤、坐剤、液剤、乳濁液、懸濁液、エアロゾル剤、スプレー剤、その他の使用に適した形態用の、通常の、無毒性で、医薬として許容しうる担体と混ぜ合わせることができる。更に、必要ならば、助剤、安定剤、増粘剤等を使用してもよい。これらの担体、賦形剤は必要に応じて無菌化処理を施したものを使用してもよく、また製剤化した後に無菌化処理を行うこともできる。FR901228またはその塩は、導入遺伝子の発現増強あるいは再活性化が必要とされる状態に対して所望の効果を生じるのに十分な量を当該発現増強剤や再活性化促進剤に含ませればよい。特に、本発明の当該発現増強剤や再活性化促進剤を遺伝子治療に使用する場合には、非経口的投与、即ち静脈内投与、筋肉内投与、組織内直接投与、鼻腔内投与、皮内投与、髄液内投与、胆管内投与、腔内投与等が好ましく、また、導入遺伝子の発現や再活性化が要求される部位や器官に直接投与し得るリボソーム法等も好適に使用することができる。

【0021】活性成分であるFR901228またはその塩の治療上有効な用量は、処置すべき個々の患者の年齢および状態、ならびに導入遺伝子の種類や、当該遺伝子の発現増強や再活性化促進を必要とする疾患の種類によっても相違し、またそれらに依存して決定される。例えば、持続静脈内投与の場合、成人1日1回、1mg/m<sup>2</sup>

～50mg/m<sup>2</sup>が好ましく、更に3mg/m<sup>2</sup>～30mg/m<sup>2</sup>がより好ましい。

【0022】本発明の導入遺伝子の発現増強剤ならびに導入遺伝子の再活性化促進剤の投与方法は、導入遺伝子の発現増強作用、再活性化促進作用が得られれば、特に限定されない。医薬製剤の形で使用する場合には、経口、非経口的に1日1回から数回にわたって投与することができる。特に遺伝子治療に使用する場合には、その使用の特殊性を考慮して、導入遺伝子の発現、再活性化に最も適した投与方法を適宜選択して使用する。例えば、腫瘍に対する遺伝子治療の場合、腫瘍細胞への直接投与（例えばリポソーム法）が好ましい。

【0023】本発明は、導入遺伝子の発現を増強させること、ならびに発現抑制にある導入遺伝子の、その抑制を解除することを特徴とするものであり、当該効果は、導入遺伝子との相互作用が重要な要因となる。したがって、導入遺伝子の投与と、本発明の発現増強剤または再活性化促進剤の対象への投与（インビボ、インビトロ）の時期は、所望の効果に応じて適宜決定される。例えば導入遺伝子の発現増強を目的とする場合には、当該導入遺伝子の投与と同時に、あるいは投与後に本発明の導入遺伝子発現増強剤を投与することが好ましい。一方、既に導入された遺伝子の再活性化の促進を目的とする場合には、導入遺伝子の投与後、再活性化が必要な時に本発明の導入遺伝子再活性化促進剤を投与することが好ましい。導入遺伝子の投与後に本発明の導入遺伝子の発現増強剤または再活性化促進剤を投与する場合、その投与のタイミングは、所望とする効果やその程度、先に導入された遺伝子の発現状況（発現の程度や導入遺伝子の存在場所等）に応じて適宜決定される。

【0024】本発明は特に遺伝子治療に好適に使用することができる。例えば癌に対する遺伝子治療としては、自殺遺伝子の導入やDNAワクチン等が挙げられる。自殺遺伝子の導入としては、抗癌剤5-フルオロシチン（5-FU）の抗癌活性体への変換酵素であるシトシンデアミナーゼ遺伝子の癌細胞への導入が挙げられ、当該遺伝子の癌細胞内での発現を本発明により増強させることができる（癌細胞特異的に5-FUを効率的に活性体に変換することにより抗腫瘍効果を誘導する）。或いは、ヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼ（HSV-TK）遺伝子を癌細胞に導入し、その後、抗ウイルス剤であるガンシクロビル（GCV）を投与する。HSV-TKにより生じたリン酸化型GCVが癌細胞のDNA合成を阻害し、抗腫瘍効果を発揮する。

【0025】DNAワクチンとしては、癌細胞で特異的に発現している癌抗原遺伝子が挙げられ、当該遺伝子を癌患者に導入することにより、あるいは発現抑制されている内因性癌抗原遺伝子の再活性化により、また、あるいはその両方により、癌抗原性遺伝子の機能発現を増強させることによって患者の癌免疫を高めることができ

る。

【0026】癌に対する遺伝子治療においては、他にp53遺伝子や、サイトカイン遺伝子（例えばIL2、IL12遺伝子）、アンチセンス遺伝子（K-rasアンチセンス）等を用いることができる。また、嚢胞性線維症の遺伝子治療としてはCFTR遺伝子を、血友病の遺伝子治療としては凝固因子遺伝子を使用することができる。

#### 【0027】

【実施例】以下、本発明を実施例にて具体的に且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

#### 【0028】実施例1

##### 1. 実験材料・実験方法

##### (1) 薬剤

特公平7-64872号公報の記載に準じて単離、精製されたFR901228を用いた。インビボでの実験には、FR901228を等張緩衝液(BSS, 137mM NaCl, 5.4 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH7.6)で溶解、希釈したものをを用いた。当該溶液はリポソームの調製の際にも使用した(BSS/FR901228溶液)。インビトロの、細胞を用いる実験ではFR901228を10%の牛胎児血清を含む細胞培養用培養液(50 units/mlペニシリンおよび50 μg/mlストレプトマイシン添加ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM))で溶解、希釈したものをを用いた。

##### 【0029】(2) ベクター

pCMV-luciベクターは、pGEM-luciベクター(Promega社製)の蛍ルシフェラーゼ遺伝子のBamHI-XhoI切断断片を、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ヒト成長ホルモン第一イントロンおよびSV40初期ポリAシグナル配列を含むpcDNA3ベクター(Invitrogen社)のBamHI-XhoI切断箇所と結合させることにより構築した。上記ベクターの構築は、当分野で通常行なわれている手法を適宜組み合わせで行なうことができる。

##### 【0030】(3) 細胞および細胞培養

ヒト胎児腎細胞(HEK-293)、ヒト子宮癌細胞(Hela-S3)、マウス黒色肉腫細胞(B16-F1)およびマウス線維芽細胞(NIH3T3)は、American Type Culture Collection(ATCC)より購入した。各細胞は、10%牛胎児血清、50 units/mlペニシリンおよび50 μg/mlストレプトマイシン添加ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)にて、5%炭酸ガス、95%大気存在下、37℃で培養した。

##### 【0031】(4) 形質転換細胞

形質転換細胞B16/L細胞は、B16-F1細胞に、pCMV-luciベクターをLipofect Amine Plus(Gibco BRL社製)にて導入し、抗生物質G418(Geneticin, Gibco BRL社製)に対する耐性クローンを選別し、それらクローンよりルシフェラーゼ活性発現を指標にすることにより取得した。

##### 【0032】(5) 脂質

コレステロール(Chol)、卵黄由来ホスファチジルコリ

ン (ePC) および卵黄由来スフィンゴミエリン (eSph) は、それぞれSigma社より購入した。牛脳由来ホスファチジルセリン (bPS) は、Avanti Polar Lipids社より購入した。ジオレイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) およびジメチルアミノエタンカルバモイルコレステロール (DC-Chol) は、NOF社から購入した。

#### 【0033】(6)HVJの調製

HVJ (Z系統、大阪大学微生物研究所で分離されたもの) は、鶏卵10日胚の絨毛尿膜液中、35.5℃で増殖させた。HVJは、27,000g、30分間の遠心により集め、BSSに懸濁した。HVJ懸濁液は、使用するまで4℃で保存した。HVJのRNAゲノムは、使用直前にUV照射 (198 mJ/cm<sup>2</sup>) することにより不活化した。

#### 【0034】(7)リボソームの調製

各脂質は、30 mMの濃度でクロロホルムに溶解した。陽イオン性リボソーム (DCリボソーム) の調製においては、ePC、DOPE、eSph、CholおよびDC-Cholを16.7:16.7:16.7:40:10のモル比で使用した。各脂質溶液500μlをガラスチューブに移し、減圧乾燥することにより、薄層脂質フィルムとした。この乾燥脂質混和物を、ボルトックスミキサーにて30秒間攪拌することにより、ベクターDNA (200 μg) を含む200μlのBSSあるいはBSS/FR901228溶液で再溶解した後、30秒間静置した。この操作を8回繰り返した。この混和物に800μlのBSSを加えた後、セルロースアセテートメンブレン (ポアサイズ0.45μm) を通し、メンブレン上に残ったリボソームを500μlのBSSで集めた。この混和物を再びセルロースアセテートメンブレン (ポアサイズ0.2μm) を通し、同様にして2mlのBSS中に集めた。

#### 【0035】(8)HVJリボソームの調製

上記(7)で調製したDCリボソーム懸濁液に30,000血球凝集ユニット (hemagglutinating units) のHVJの懸濁液を加え、氷上で10分間混合した。その後、この懸濁液を、弱く攪拌しながら、37℃、2時間保温した。懸濁液を不連続シュクロース密度勾配 (30%シュクロース/BSS溶液 6.5 ml) 上に付し、スイングバケットローターにて、4℃、62,800gで2時間遠心分離した。HVJ/リボソーム会合体は、BSSと30%シュクロース/BSS溶液との間に顕在化した。HVJ/リボソーム会合体 (以下HVJ-DCリボソームともいう) を集め、2mlのBSSに懸濁し、培養細胞の実験に供した。最終的なHVJ-DCリボソーム中のベクターDNAのトラップ効率は約60%であった。

#### 【0036】(9)遺伝子導入培養細胞におけるルシフェラーゼ活性の測定

1×10<sup>5</sup>個のB16-F1細胞を遺伝子導入の前日に、6穴組織培養用プレートの各穴 (直径35 mm) に植え込んだ。培養液を、試験濃度のFR901228を含む培養液に交換した後、pCMV-luciベクターを包含するHVJ-DCリボソーム (20μl) を添加することにより遺伝子導

入を行った。試験時間経過後、細胞を集め、ルシフェラーゼ遺伝子の発現状態を調べた。B16/L細胞を用いた実験においてはHVJ-DCリボソームの添加を行わないこと以外、B16-F1細胞と同様の操作を行った。ルシフェラーゼの発現は、ルシフェラーゼアッセイキット (Promega社) により測定した。総蛋白質量は、BCA法にて測定した。ルシフェラーゼ活性は、比較蛍光ユニット (relative light unit, RLU) /総蛋白質量、あるいはRLU/総蛋白質量のFR901228未投与時に対するFR901228投与時の比 (Luciferase activity ratio) として表示した。実験は2連あるいは3連で、同じ実験を3回繰り返すことにより行った。

#### 【0037】(10)動物への遺伝子導入におけるルシフェラーゼ活性の測定

6週令の雄性C57BL/6マウスを、ペントバルビタール (1 mg) の腹腔内投与により麻酔し、1×10<sup>6</sup>個のB16-F1細胞あるいはB16/L細胞を背部皮下に移植した。2週間後、移植腫瘍は、約10mm径の腫瘍塊となった。B16/L細胞の場合は、0μg、27μgあるいは54μgのFR901228を含む200μlのBSS溶液を直接腫瘍内に投与した。B16-F1細胞の場合は、0μgあるいは27μgのFR901228およびpCMV-luciベクターを包含する200μlのHVJ-DCリボソーム溶液を直接腫瘍内に投与した。両細胞のいずれの場合も、投与24時間後、全腫瘍塊を取り出し、直ちに液体窒素にて急速冷凍した。溶解後、腫瘍塊を細断し、500μlのPromega社製、Passive lysis bufferで完全に粉砕均質化した。遠心分離後、上清のルシフェラーゼ活性を上記(9)に記述した方法で測定した。

#### 【0038】2. 結果

##### (1)遺伝子導入におけるFR901228による導入遺伝子の発現増強 (インビトロ)

HVJ-DCリボソームを用いて、pCMV-luciベクターをFR901228存在下でB16-F1細胞に導入し、ルシフェラーゼ遺伝子の発現増強を調べた。FR901228は、遺伝子導入後24時間で濃度依存的なルシフェラーゼ遺伝子発現増強作用を示した (図1A)。ルシフェラーゼ遺伝子は、10nMおよび100nMのFR901228存在下で、それぞれ2.6倍および5.2倍発現増強された。同様な実験を、NIH3T3細胞を用いて実施した。NIH3T3細胞における導入ルシフェラーゼ遺伝子の発現は軽微であったが、FR901228を5nM、10nMおよび100nM存在させることにより、その発現は、それぞれ、700倍、3400倍および5200倍増強された (図1B)。同様な導入ルシフェラーゼ遺伝子の発現増強は、ヒト胎児由来腎細胞HEK293および子宮癌細胞Helaにおいても観察された。また、B16-F1細胞において、ルシフェラーゼ遺伝子の有意な発現増強は、100nMのFR901228にて30分間の処理を行うことにより達成された (図2)。以上より、遺伝子導入時にFR9



01228を作用させると、導入遺伝子の著しい発現増強が誘導されることが示された。

【0039】(2)ゲノムに組み込まれた遺伝子のFR901228による再活性化(インビボ)

B16/L細胞は、CMVのプロモーターに制御されるルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに組み込んでおり、寄主のクロマチンによる転写制御を受けつつ、安定的にルシフェラーゼ遺伝子を発現している。本細胞を用いて、導入遺伝子のFR901228による再活性化を調べた。FR901228で処理した後24時間で、B16/L細胞において濃度依存的なルシフェラーゼ遺伝子発現増強作用を示した(図3)。FR901228を5nM、10nMおよび100nM存在させることにより、その発現は、それぞれ、7.7倍、15.3倍および24.7倍増強された。ルシフェラーゼ遺伝子の有意な発現増強は、100nMのFR901228処理において、処理後6時間から観察され始め、その後24時間持続した。以上より、FR901228は、ゲノムに組み込まれた遺伝子を再活性化することにより、遺伝子導入後の持続的高発現を誘導できることが示された。

【0040】(3)遺伝子導入におけるFR901228による導入遺伝子発現増強作用(インビボ)

C57BL/6マウスの皮下に移植したB16-F1細胞の腫瘍塊に、27 $\mu$ gのFR901228およびpCMV-luciベクターを封入したHVJ-DCリボソームを腫瘍内投与することにより、FR901228の導入遺伝子発現増強作用を調べた。対照として、ルシフェラーゼ遺伝子のみをHVJ-DCリボソームにより腫瘍塊に導入すると、低レベルのルシフェラーゼ遺伝子の発現しか観察されなかった。一方、ルシフェラーゼ遺伝子をFR901228とともに封入したHVJ-DCリボソームを腫瘍塊に導入すると、ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、FR901228のない場合と比べて5.3倍に増強された(図4)。以上より、遺伝子導入時にFR901228を作用させると、導入遺伝子の著しい発現増強が誘導されることが個体レベルでも示された。

【0041】(4)ゲノムに組み込まれた遺伝子のFR901228による再活性化(インビボ)

C57BL/6マウスの皮下に移植したB16/L細胞の腫瘍塊に、FR901228を腫瘍内投与することにより、FR901228の導入遺伝子再活性化作用を調べた。FR901228(BSSに溶解)を、27 $\mu$ gあるいは54 $\mu$ g腫瘍塊に投与すると、ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、FR901228を投与しない場合と比べて、いずれの投与量でも2.5倍に増強された(図5)以上より、FR901228はゲノムに組み込まれた遺伝子を再活性化することにより遺伝子の導入後の持続的高発現を誘導できることが個体レベルでも示された。

【0042】実施例2

1. 実験方法

8週令の雄性C57BL/6マウスを、ペントバルビタール(1mg)の腹腔内投与により麻酔し、5 $\times$ 10<sup>6</sup>個のB16-F1細胞(実施例1参照)を右横腹皮下に移植した。7日後、移植腫瘍は、約10mm径の腫瘍塊となった。各種投与量のFR901228(0、0.001、0.01、0.1、1、2.7、5.4、10 $\mu$ g)およびpCMV-luciベクターを封入したHVJ-DCリボソームを実施例1に準じて調製した。当該HVJ-DCリボソーム100 $\mu$ l(pCMV-luciベクター40 $\mu$ g含有、BSSで希釈)を直接腫瘍内に投与した。投与24時間後、全腫瘍塊を取り出し、直ちに液体窒素にて急速冷凍した。溶解後、腫瘍塊を細断し、5倍容量のPromega社製、Passive lysis bufferでホモジナイズした。遠心分離(12,000rpm、5分間)後、上清を回収し、ルシフェラーゼ活性を実施例1(9)に記述した方法で測定した。測定値は5匹のマウスの平均値で示した。

【0043】2. 結果

結果を図6に示す。FR901228存在下では、ルシフェラーゼ遺伝子発現増強作用が確認された。

【0044】実施例3

1. 実験材料

(1)薬剤

特公平7-64872号公報の記載に準じて単離、精製されたFR901228を等張緩衝液(BSS, 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM Tris-HCl pH7.6)で溶解、希釈したものを用いた(BSS/FR901228溶液)。ガンシクロビルは、田辺製薬より入手し、BSSで溶解、希釈したものをを用いた。

【0045】(2)ベクター

pCMV-tkベクターは、I型ヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-TK)遺伝子の1.7kbの断片をpcDNA3(Invitrogen社)のEcoRI/XhoI切断箇所に挿入することによって構築した。

【0046】2. 実験方法

8週令の雄性C57BL/6マウスを、ペントバルビタール(1mg)の腹腔内投与により麻酔し、B16-F1細胞(5 $\times$ 10<sup>6</sup>個/100 $\mu$ l)を右横腹皮下移植した。下記表1のスケジュールに従って、腫瘍細胞移植7日後に100 $\mu$ lのHVJ-DCリボソーム(pCMV-tkベクター(40 $\mu$ g)およびFR901228(2.7 $\mu$ g)の両方を包含するもの、どちらか一方を包含するもの、あるいは両方とも含まないもの；それぞれ実施例1に準じて調製)を直接腫瘍内に注入し、次いで移植13日後、即ちHVJ-DCリボソーム注入6日後にガンシクロビル含有BSSあるいは非含有BSSを腹腔内投与した。ガンシクロビル投与は、1.5mg/匹/日の投与量で、1日1回5日間継続して実施した。

【0047】

【表1】

群	HVJ-DC リボソーム		GCV	n
	ベクター-DNA	FR901228 (2.7 $\mu$ g/body)		
A	pCMV-tk	+	+	9
B	pCMV-tk	-	+	7
C	BSS	-	+	7
D	pCMV-tk	-	-	6
E	pCMV-tk	+	-	7
F	BSS	+	-	7

ベクター-DNA 中の BSS は、pCMV-tk の代わりに対照として BSS をリボソーム中に添加したことを意味する。

【0048】尚、腫瘍の容量は、腫瘍細胞注入後から1週間に2回の間隔で下記計算式により算出した。

【0049】

【数1】

$$\frac{\text{長径} \times \text{短径}^2}{2}$$

【0050】3. 結果

結果を図7に示す。チミジンキナーゼ遺伝子の導入ならびにそれに続くガンシクロビル投与による腫瘍増殖の抑制効果において、FR901228存在下では、非存在下に比べて著明な腫瘍抑制効果を認めた。即ち、本発明の、チミジンキナーゼ遺伝子/ガンシクロビルという、自殺遺伝子による癌遺伝子治療における有用性が確認された。

【0051】

【発明の効果】ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有するFR901228またはその塩からなる、本発明の導入遺伝子の発現増強剤、再活性化促進剤はインビトロのみならずインビボにおいても優れた導入遺伝子の発現増強作用、再活性化促進作用を有する。したがって、臨床での使用、特に遺伝子治療に好適に使用し得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1Aは、B16-F1細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現をFR901228が濃度依存的に増強することを示すグラフである。縦軸はFR901228未投与時に対するFR901228投与時のルシフェラーゼ活性の比を、横軸はFR901228の濃度を示している。図1Bは、NIH3T3細胞におけるルシフェラーゼ遺

伝子の発現をFR901228が濃度依存的に増強することを示すグラフである。縦軸はFR901228未投与時に対するFR901228投与時のルシフェラーゼ活性の比を、横軸はFR901228の濃度を示す。

【図2】FR901228の、B16-F1細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現増強作用を経時的に調べた結果を示すグラフである。縦軸はルシフェラーゼ活性を、横軸はトランスフェクションからの経過時間を示す。

【図3】ルシフェラーゼ遺伝子がゲノムに組み込まれたB16/L細胞において、FR901228が濃度依存的にルシフェラーゼ遺伝子発現を再活性化することを示すグラフである。縦軸はFR901228未投与時に対するFR901228投与時のルシフェラーゼ活性の比を、横軸はFR901228の濃度を示している。

【図4】マウスにおいて、FR901228存在下でルシフェラーゼ遺伝子を導入することで導入遺伝子の発現が増強されることを示すグラフである。

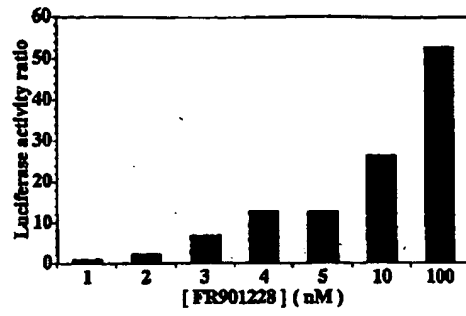
【図5】マウスにおいて、FR901228がルシフェラーゼ遺伝子発現を再活性化することを示すグラフである。

【図6】マウスにおいて、各種投与量のFR901228存在下でルシフェラーゼ遺伝子を導入することで、導入遺伝子の発現が増強されることを示すグラフである。

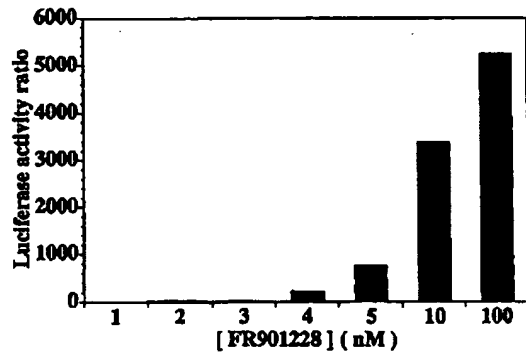
【図7】マウスにおいて、FR901228存在下にチミジンキナーゼ遺伝子を導入することで、ガンシクロビルの腫瘍増殖抑制効果が増強されることを示すグラフである。縦軸は腫瘍容量を示し、横軸はB16-F1細胞移植後の経過日数を示している。

【図1】

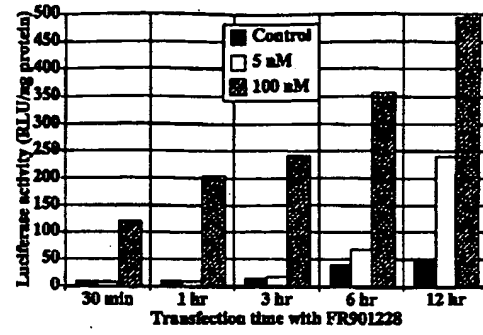
(図1A)



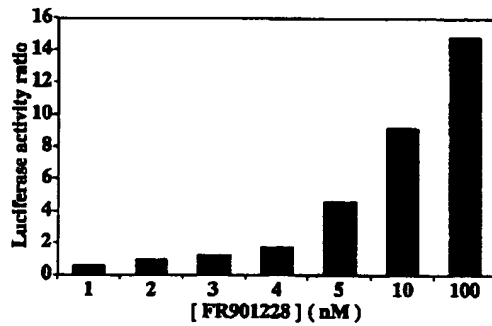
(図1B)



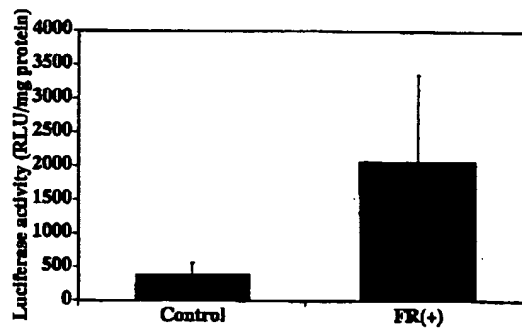
【図2】



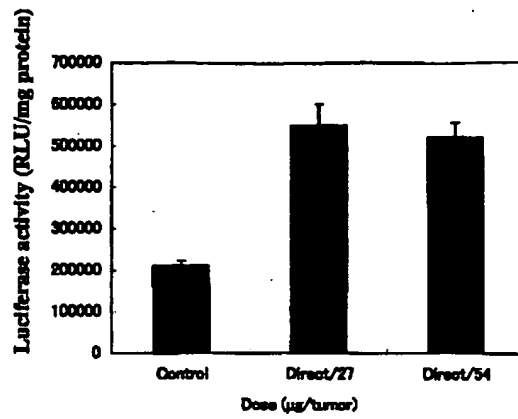
【図3】



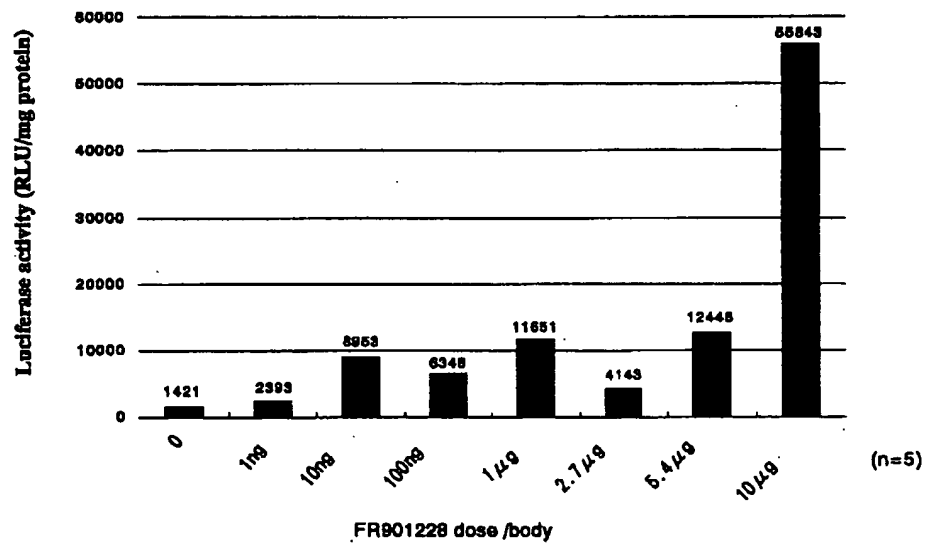
【図4】



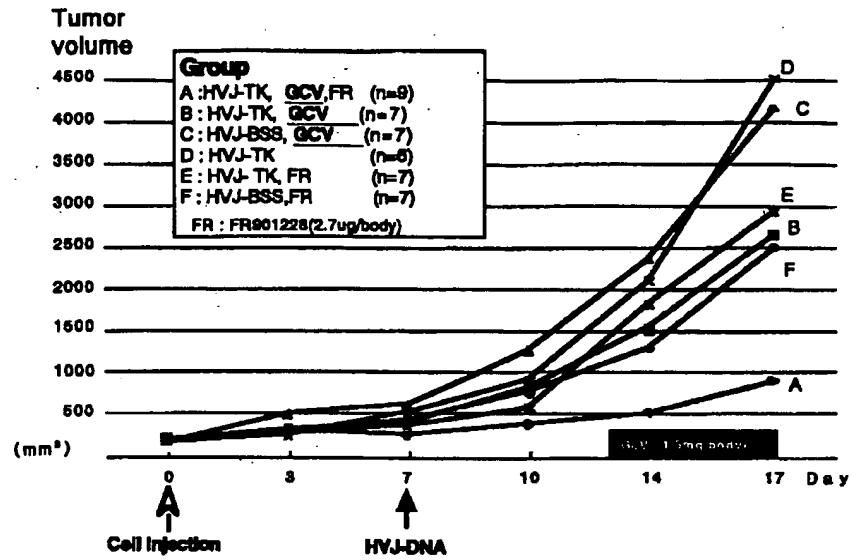
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

C 1 2 N 9/99

15/09

識別記号

Z N A

F I

A 6 1 K 37/02

C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

Z N A A

(72) 発明者 中島 秀典

茨城県つくば市緑ヶ丘29-2

Fターム (参考) 4B024 AA01 AA12 BA08 CA04 DA02

DA03 EA04 GA11 HA17

4C084 AA02 AA13 BA01 BA10 BA15

BA26 BA27 BA28 CA56 NA14

ZC012 ZC202 ZC412

4H045 AA30 BA13 BA32 BA33 CA11

DA55 EA20 EA28 FA71

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**